

· 论 著 ·

某幼儿园一起脑炎疫情流行病学及病原研究

邱晓枫, 谢立, 黄志成, 杨旭辉, 王婧, 潘劲草

杭州市疾病预防控制中心 浙江 杭州 310021

摘要: 目的 查明杭州某县市一家幼儿园无菌性脑炎疫情的流行病学特征及病原。方法 通过查阅幼儿园晨检、因病缺课记录; 某医院发热门诊就诊记录和现场个案调查展开流行病学调查。采集患儿粪便、血清标本先通过荧光 RT-PCR 和 ELISA 方法初筛, 然后选肠道病毒通用阳性标本进行病毒分离、培养; 通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 鉴定上述培养物, 并扩增埃可病毒 9 型(简称 ECHO-9) VP1 区全长基因和序列测定, 利用生物信息学软件对序列进行分析, 构建基因进化树。结果 该幼儿园共累计报告病例 18 例, 发热、头痛、呕吐为主要症状。从采集的 7 份样本中分离到 ECHO 阳性毒株 2 株, VP1 基因全序列测定结果显示其与 ECHO-9 代表株核苷酸和氨基酸的相似性最高, 分别为 73.5%~93.6%、85.4%~97.0%。结论 引起此次疫情的病原为 ECHO-9。进化树分析表明与近年来已报道的 ECHO-9 相比有一定的亲缘关系。

关键词: 埃可病毒 9 型; 病毒性脑炎; VP1 基因

中图分类号: R512.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2014)03-0309-04

Research on an encephalitis epidemic event in a kindergarten by epidemiology and etiology

QIU Xiao-feng, XIE Li, HUANG Zhi-cheng, YANG Xu-hui, WANG Jing, PAN Jing-cai

Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310021, China

Abstract: Objective To reveal the epidemiological characteristics and pathogens of an epidemic of children aseptic encephalitis in a kindergarten in one city of Hangzhou. **Methods** An epidemiological survey of this disease was carried out through consulting the record of morning test and absence for illness in kindergarten, the visit record of fever clinic in a hospital, and on-the-spot investigation. The feces and serum samples of patients were detected by using fluorescent RT-PCR and ELISA for preliminary screening of enterovirus. Then the enterovirus in positive specimens were identified by RT-PCR after isolation and culture. The full-length VP1 gene of echovirus 9 strains were amplified and sequenced. Then sequence analysis by bioinformatics software was conducted to construct phylogenetic tree. **Results** Eighteen viral encephalitis cases were reported in the kindergarten altogether, with fever, headache, vomiting as the main symptoms. Two ECHO viral strains were isolated from 7 specimens. VP1 gene complete sequence analysis indicated that the two strains belonged to echovirus type 9, due to high similarity to nucleotide and amino acid of echovirus type 9 reference strains, 73.5%~93.6% and 85.4%~97.0% respectively. **Conclusion** The echovirus type 9 was confirmed to cause the children viral encephalitis outbreak in the kindergarten in one city of Hangzhou. Phylogenetic tree analysis showed a certain genetic relationship between the pathogen and the reported ECHO-9 in recent years.

Key Words: Echovirus type 9; Viral encephalitis; VP1 gene

2010年6月中下旬,杭州某市医院儿科病房收治多例发热、头痛伴呕吐症状病例,均来自同一家幼儿园,临床诊断为病毒性脑炎病例。为查明疾病流行特征、明确病原病因,控制疾病蔓延传播,指导临床救治,杭州市疾控中心及时组织开展了现场流行病学调查。结合流行病学调查、临床表现、实验检测结果,确定此次疫情是一起埃可病毒 9 型(Echovirus type 9, ECHO-9)引起的病毒性脑炎暴发。

1 材料与方法

1.1 标本及细胞来源 现场流行病学调查中采集未用抗病毒药物的现症患者粪便样本 7 份、病人血清 5 份,立即送杭州市疾病预防控制中心微生物检验实验室,保存至 -70℃ 冰箱中待检。人横纹肌肉瘤细胞(RD)由浙江省疾病预防控制中心病毒所提供。

1.2 流行病学调查方法 现场流行病学调查人员自行设计病例个案调查表,统一培训调查人员;通过教师、家长访谈,查阅幼儿园健康晨检、因病缺课记录、当地医疗机构门诊就诊记录搜集病例病案资料。

1.3 病毒核酸检测及血清学检测 首先分别使用 QIAamp Viral RNA Mini Extraction Kit 74104 (QIA-

基金项目: 杭州市科技发展计划项目(20120633B22)

作者简介: 邱晓枫(1979-),女,硕士,微生物主管技师,主要从事肠道病毒的研究工作。

通讯作者: 潘劲草, E-mail: jingcaopan@sina.com

GEN, Valencia, CA, USA) 提取粪便样本中的病毒核酸 RNA。通过实时荧光 RT-PCR 试剂盒(上海之江,批号均为 20100301)进行流感病毒及肠道病毒通用、EV71、柯萨奇 A16、诺如病毒核酸检测。埃可病毒 IgM 抗体 ELISA 检测试剂盒(德国赛润,批号 SFB-DT)检测病人血清。

1.4 病毒分离培养 病毒分离按照肠道病毒分离操作规程进行。荧光 RT-PCR 鉴定为肠道病毒阳性粪便标本预处理后,接种 RD 细胞置于 36 °C 培养,每天观察细胞病变(CPE),CPE 达到 +++~++++ 时收获。

1.5 ECHO-9 核酸鉴定及 VP1 区全长扩增 病毒 RNA 的 RT-PCR 采用 TaKaRa One Step RT-PCR Kit (TaKaRa 公司)引物序列请见表 1^[1,2],引物 P-2 和

E31 扩增 PCR 产物为 753 bp;引物 EVP-4 和 OL68-71R 扩增 PCR 产物为 653 bp;VP1-F 和 VP1-R 扩增 ECHO-9 VP1 区全长产物大小为 903 bp,反应条件均为 50 °C 15 min、94 °C 2 min、94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min,经 35 个循环,72 °C 7 min 4 °C 保存。取扩增产物各 5 μl 于 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察是否有预期分子量大小的条带出现。

1.6 ECHO-9 VP1 区域的序列测定和分析 使用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 对 PCR 产物进行纯化。纯化后的扩增产物序列测定委托上海生工完成。使用 DNASTar 及 MEGA4.1 软件进行分析。用于同源性比较和构建基因进化树的 ECHO-9 病毒各参比序列均来自 NCBI 的 GenBank,详见表 2。

表 1 RT-PCR 引物序列

编号	引物名称	序列(5'→3')	位置 ^a	产物大小(bp)
1	P-2	5'-CCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAAT-3'	445-469	753
2	E31	5'-TGGTGCTGGAAGTTACCAGA-3'	1197-1178	
3	EVP-4	5'-CTACTTGGGTGTCCGTGTT-3'	542-561	653
4	OL68-71R	5'-GGGAACCTCCAGTACCAYCC-3'	1194-1175	
5	VP1-F	5'-GGTAGGTTGCTGACACAATACC-3'	2481-2503	903
6	VP1-R	5'-CACATACACAGCTCCAGATTCCTGG-3'	3349-3383	

注:a 参照 ECHO-9 原型株 Hill 株和 Barty 株(DDBJ,EMBL,GenBank 登录号分别为 X84981、X92886)。

表 2 ECHO-9 病毒杭州分离株与各参比序列概况

GenBank 登录号	来源国家	标本采集时间(年)
KC182534	中国杭州 China	2010
KC182535	中国杭州 China	2010
JN203736	印度 India	2007-2009
FJ868342	澳大利亚 Australia	2006
AM711077	法国 France	2006
GQ329789	中国山东 China	2005
EU604665	韩国 South Korea	2005
AB268185	中国云南 China	2000
GU142894	澳大利亚 Australia	1998
AB055923	日本 Japan	1997
X92886	德国 Germany	1957
X84981	德国 Germany	1953

2 结果

2.1 流行病学调查结果

2.1.1 发病概况 对本次疫情病例定义如下:6 月 1 日-28 日期间该幼儿园体温 ≥38 °C,同时伴头痛、呕吐等症状之一的患者。该幼儿园共有 4 个年级,7 个班,共有学生 228 人,教职工 14 人,累计报告病例 18

例,幼儿罹患率 7.89%,均为学生,教职员工未发病,患者家庭及其周围邻居无类似患者。

2.1.2 流行病学分布 时间分布:6 月 6 日发生首例病例,男性,6 岁主要症状呕吐、发热,最高温度为 38.5 °C,病程 16 d。随后陆续有病例发生,22 日发生某例病例,流行时限 16 d。病例分布于 7 个班级中的 6 个,发病最多班级 6 例。4 岁 4 例,5 岁 1 例,6 岁 12 例,7 岁 1 例。男女发病比例为 1.25:1,其中男童罹患率为 9.80%,女童罹患率为 6.35% ($\chi^2 = 0.92, P = 0.34$)。

2.1.3 临床表现 患者主要症状有发热,占 100%,体温多为 38 °C ~39 °C;头痛占 88.89% (16/18),呕吐占 66.67% (12/18),咽痛占 11.11% (2/18),卡他症状占 5.56% (1/18),皮疹占 11.11% (2/18);病程一般 3 d ~7 d,病情自愈性明显,无肺炎、心肌炎等并发症发生,无肢体抖动、嗜睡症状,无明显脑炎后遗症。

2.1.4 患者血常规、生化检测结果 显示中性粒细胞、淋巴细胞、转氨酶等指标均在正常范围;7 份粪便样本中 5 份检出肠道病毒核酸阳性,EV71、柯萨奇 A16 病毒、诺如病毒均阴性;5 份血液标本检测埃可病毒 IgM 抗体,其中 2 份阳性。

2.1.5 病毒分离结果 5 份粪便标本通过氯仿处理后振荡离心,吸取上清液并分别加入双抗 100 U/ml

青霉素和 100 U/ml 链霉素 4 ℃ 处理 2 h。将处理好的标本按培养液体积的 1/10 分别接种到已单层生长 RD 细胞,置于 5% CO₂、36 ℃ 恒温培养箱中,每日观察细胞。编号 331 标本在第二代培养物的第 3 d 出现细胞病变,第 6 d 细胞完全病变成拉网状;传第三代结果同第二代。编号 332 标本在第三代培养物的第 3 d 出现细胞病变,第 7 d 细胞有病变但未成拉网状;继续传第四代结果和第三代一致。其余标本均未发生细胞病变。对病毒培养物进行荧光 RT-PCR 鉴定,结果肠道病毒通用均阳性,CT 值在 10 左右。

2.1.6 ECHO-9 病毒的 RT-PCR 鉴定 对上述 2 份阳性毒株进行 RT-PCR 扩增,均能得到 ECHO-9 特异性核酸片段,产物大小分别为 753 bp、653 bp、903 bp。对 PCR 产物进行了纯化和并由上海生工进行序列测定分析。使用 NCBI-BLAST 对上述核苷酸序列进行比对,结果显示分离毒株均与 ECHO-9 最为相似。Hangzhou-331、Hangzhou-332 毒株 ECHO-9 VP1 区核苷酸序列在 GenBank 的基因登录号分别为 KC182534、KC182535。

2.1.7 ECHO-9 病毒 VP1 区核苷酸、氨基酸的序列分析 ECHO-9 VP1 区编码基因位于基因组 2481 位~3383 位(参考序列为 X92886),共 903 个核苷酸,编码 301 个氨基酸。用 DNASTar 中的 Megalign 软件 Clustal W 法对 VP1 核苷酸与氨基酸序列进行相似性分析(图 1、图 2)。结果显示,杭州分离的 2 株 ECHO-9 病毒之间 VP1 核苷酸水平和氨基酸水平相似性分别为 99.6% 和 99.0%。2 株 ECHO-9 病毒 VP1 核苷酸序列与参考株核苷酸相似性分别为 73.5%~93.6%;氨基酸的相似性分别为 85.4%~97.0%。通过 MEGA4.1 软件中 Bootstrap Test 的 N-J 法构建 2 株 ECHO-9 病毒与上述参考株的基因进化树(图 3),更为直观地反映出此次 ECHO-9 病毒引起的病毒性脑炎疫情的分子流行病学特征。

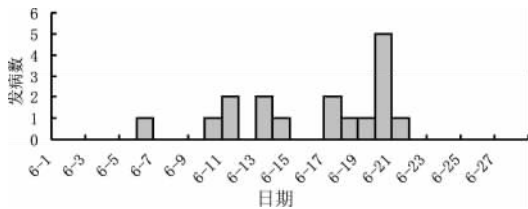
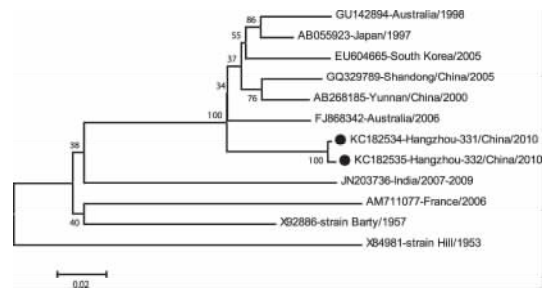


图 1 某幼儿园 ECHO 病毒脑炎发病时间分布

		核苷酸相似性												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
氨基酸相似性	1	99.6	79.5	87.7	77.7	89.2	86.2	84.0	87.2	93.6	85.3	73.7	KC182534	
	2	99.0	99.6	79.4	87.5	77.7	89.0	86.0	83.8	87.0	93.4	85.2	73.5	KC182535
	3	90.4	90.1	99.6	82.7	82.2	81.7	82.7	75.1	82.1	80.4	80.2	75.5	JN203736
	4	91.4	91.4	89.1	99.6	81.9	90.3	92.2	84.9	92.7	88.5	79.6	75.5	FJ868342
	5	90.4	90.4	90.4	89.1	99.6	80.8	81.3	74.8	81.0	79.2	79.9	75.7	AM711077
	6	91.7	91.4	89.1	91.1	88.7	99.6	89.6	87.7	90.4	91.7	81.8	76.5	GQ329789
	7	91.1	90.7	89.1	90.7	88.4	89.1	99.6	83.0	92.9	89.0	79.2	74.9	EU604665
	8	85.8	85.4	82.5	83.8	82.8	85.1	82.5	99.6	84.0	86.8	75.4	70.3	AB268185
	9	92.4	92.1	89.4	91.7	89.4	90.4	91.1	83.4	99.6	90.7	80.8	74.3	GU142894
	10	97.0	97.0	91.4	91.4	91.1	92.4	91.1	86.8	93.0	99.6	85.4	73.3	AB055923
	11	94.7	94.7	90.1	90.1	90.4	90.1	88.7	83.1	91.1	95.7	99.6	74.1	X92886
	12	86.1	85.8	85.4	84.8	83.4	84.1	83.4	76.5	83.4	86.1	87.1	99.6	X84981

图 2 杭州市分离的 ECHO-9 毒株与各代表株之间在 VP1 区核苷酸和氨基酸相似性比较(%)



注“●”标记的为杭州市分离的 ECHO-9 毒株。
图 3 杭州市分离的 ECHO-9 毒株与各代表株之间在 VP1 区的基因进化树

3 讨论

据报道在已经确定病原的无菌性脑膜炎病例中,肠道病毒占 40%~80%,其中埃可病毒占了 80%~90%^[3]。ECHO-9 是引起儿童夏季无菌性脑炎最常见的病原体之一。其引起的无菌性脑炎暴发在美国、加拿大、英国、欧洲、日本、韩国等地均有报道^[2,3]。在 1953 年一位健康儿童的肛拭子首次分离到 ECHO-9 Hill 原型株,发现对新生小鼠没有致病性^[4]。在 1957 年从一位无菌性脑炎患儿的脑脊液中分离到 ECHO-9 Barty 原型株,能引起新生小鼠肌肉损伤麻痹瘫痪。1989 年 Takaya TANAKA 报道了由 ECHO-9 感染引起横纹肌溶解导致急性肾衰的一病例研究^[5]。1993 年 MA Zuckerman 报道了一例 9 个月龄患儿 ECHO-9 脑炎急性死亡病例^[6]。在中国 2005 年山东和 2000 云南等都有分离到 ECHO-9 病毒(GenBank 中有基因序列证据)。有报道 2009 年 7 月~2009 年 10 月宁夏回族自治区吴忠市同心县发生一起由 ECHO-9 所致病毒性脑膜炎的暴发^[7,8]。根据 2006 年卫生部《人间传染的病原微生物名录》,埃可病毒属于危害程度第三类的病原微生物。轻者表现为上呼吸道感染症状,重者可以表现为无菌性脑炎、糖尿病、及横纹肌溶解导致急性肾衰等症状,也可短时间引起患儿死亡。

此次疫情共报告 18 例临床诊断病例,总发病率为 7.89%,其中男童罹患率为 9.80%,女童罹患率为 6.35%($\chi^2 = 0.92, P = 0.34$) 无统计学差异。相关传播途径调查显示,无明显的食物、饮用水传播线索;发病时间曲线(图 1)显示非点源暴发特征,流行时限较长,病例相对分散,非同代病例,考虑密切接触传播可能性较大。主要临床症状有发热、呕吐、咽喉痛。病程一般 3 d~7 d,病情自愈性明显,无明显后遗症。

本研究在患儿的粪便中发现 ECHO-9 病毒,并在血清中检出埃可病毒的 IgM 抗体,怀疑引起此次疫情的病原为 ECHO-9。进化树分析表明,此次病毒株与近年来已报道的 ECHO-9 相比存在一定的亲缘关系。通过对 ECHO-9 病毒 VP1 区核苷酸、氨基酸的序列进行相似性分析,发现杭州分离的 2 株 ECHO-9 病毒与近年来已报道的 ECHO-9 相比存在一定的亲缘关系。通过对 ECHO-9 病毒 VP1 区核苷酸、氨基酸的序列进行相似性分析,发现杭州分离的 2 株 ECHO-9 病毒与近年来已报道的 ECHO-9 相比存在一定的亲缘关系。(下转第 315 页)

一位点分辨率的高低在不同的研究中差异较大。这可能与地域、人群及菌株差异有关^[4]。株水平分型在追踪结核病传染源、结核病暴发流行调查等方面具有重要的意义。303株结核分枝杆菌被分为119个基因型,其中65株为单菌株基因型,说明本研究在株水平基因分型方面选用的这15个VNTR位点基因分型能力有一定的应用价值。

本文结果表明,在所选取的15个VNTR位点中,等位基因多态性由低到高排列分别为:ETR-C, MIRU23, ETR-B, MIRU27, ETR-D, MIRU16, MIRU39, Mtub30, ETR-A, MIRU40, Mtub39, ETR-E, MIRU10, MIRU26, Mtub21。ETR-C, MIRU23, ETR-B, MIRU27, ETR-D这5个位点多态性 $h < 0.3$,说明这5个位点用于结核分枝杆菌的基因分型效果较差,提示这些位点的进化较慢,对发现更远期的进化可能有重要的提示作用^[5]。而Mtub21、MIRU26、MIRU10等位点基因分型效果较好。多态性高的位点提示进化速度快,适宜于分型研究。据此筛选分辨率更好的位点用于今后的研究。

聚类分析得知,I群含262株菌,占86.47%,可分成91个基因型;II群含12株,占3.96%,可分成6个基因型;III群含15株菌,占4.95%,可分成11个基因型;IV群含14株菌,占4.62%,可分成11个基因型。说明I群菌株在江西是主要的优势流行菌群,也

是传播的主要类型。21例有治疗史的患者菌株基因分型全部分布在I群和II群中,但由于样本量较少,尚且不能判断治疗史与基因分型是否相关,还需进一步研究。但加强这类菌株的研究和监测,对本省结核病的防治工作具有积极意义。

考虑到江西省既往无此类结核杆菌基因分型的研究,故作本文分析讨论,为今后开展更深入的结核分枝杆菌分型研究提供参考。

参考文献

- [1] Savine E, Warren RM, Vander Spuy GD, et al. Stability of variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4561-4566.
- [2] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity [J]. Clin Microbiol, 1988, 26(11): 2465-2466.
- [3] 苏云开, 余琴, 吕冰, 等. 内蒙古地区结核分枝杆菌串联重复序列基因多态性分析[J]. 疾病监测, 2013, 30(4): 257-261.
- [4] 郑晓静, 郑素华, 杜博平, 等. 多位点可变数量串联重复序列分析在北京家族结核分枝杆菌基因分型中的应用及位点筛选[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(7): 957-961.
- [5] 李墨, 焦伟伟, 孙桂芝, 等. 不同VNTR位点组合用于北京基因型结核分枝杆菌基因分型的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(6): 505-509.

收稿日期: 2013-10-11

(上接第311页)

-9病毒之间VP1核苷酸水平和氨基酸水平相似性分别为99.6%和99.0%,使它们在进化树中形成紧密相连的一小簇,并且呈单源性的发生关系,说明本次疫情暴发很可能是单一基因型的ECHO-9病毒引起的。与10株参考株核苷酸和氨基酸的相似性分别为73.5%~93.6%、85.4%~97.0%,其中与AB055923日本1997年分离ECHO-9病毒株最相似(图1、图2)。通过MEGA4.1软件中Bootstrap Test的N-J法构建2株ECHO-9病毒与上述参考株的基因进化树(图3),更为直观地反映出此次病毒性脑炎疫情的分子流行病学特征。此次分离的两株ECHO-9病毒株与AB055923-日本1997、FJ868342-澳大利亚2006、GQ329789-中国山东2005、AB268185-中国云南2000、EU604665-韩国2005、GU142894-澳大利亚1998为同一簇,有较近的亲缘性。

疫情发生后,采取了相应的防控措施,包括幼儿园做好健康晨检,发现有发热、呕吐、皮疹患儿立即隔离治疗,组织开展幼儿园教室、厕所消毒,针对性的切断传播途径,加强教室、卧室、生活场所卫生与通风,周边地区开展应急监测,及时发现类似疫情,疫情随即得到控制。

参考文献

- [1] Tsuguto F, Hiroyuki I, Nobuhiko O, et al. Usefulness of Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Echovirus Aseptic Meningitis Using Cerebrospinal Fluid [J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62(6): 455-457.
- [2] Akasu Y. Outbreak of Aseptic Meningitis due to ECHO-9 in Northern Kyushu Island in the Summer of 1997 [J]. Kurume Med J, 1999, 46(2): 97-104.
- [3] CDC. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity, United States, 2003 [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2003, 52(32): 761-764.
- [4] Eggers HJ, Sabin AB. Factors determining pathogenicity of variants of ECHO 9 virus for newborn mice [J]. J Exp Med, 1959, 110(12): 951-967.
- [5] Tanaka T, Takada T, Takagi D, et al. Acute Renal Failure due to Rhabdomyolysis Associated with Echovirus 9 Infection: A Case Report and Review of Literature [J]. Jpn J Med, 1989, 28(2): 237-242.
- [6] Zuckerman MA, Sheaff M, Martin JE, et al. Fatal case of echovirus type 9 encephalitis [J]. J Clin Pathol, 1993, 46(9): 865-866.
- [7] 江晓宁, 李明星. 一起由埃可病毒9型所致病毒性脑膜炎的暴发调查[J]. 流行病学与预防保健, 2010, 26(22): 2628-2629.
- [8] 马芳, 李明星, 李丽, 等. 宁夏一起埃可病毒9型病毒性脑膜炎暴发疫情的流行病学分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(1): 44-47.

收稿日期: 2013-10-23